

氏名	高萩 敏和
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	平成26年 9月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第2項
学位論文題目	地衣共生藻の分離培養法の確立と地衣成分による光合成阻害
論文審査委員	主査 山本 好和 副査 岩崎 郁子 小峰 正史 特別 原 光二郎

論文内容要旨

※ページ数は3頁以上(図表を含む)とする。

地衣類は、藻類と菌類が共生して一つの体をつくっており、自然界において特異な存在である(図1)。地衣体を構成している共生菌(主に子囊菌類)は藻類に生育場所と水分を与え、藻類(主に緑藻の *Trebouxia* 類)は光合成で作ったリビトール、ソルビトールなどをエネルギー源として菌類に与える関係である。地衣体のほとんどが菌類で占められていて、藻類細胞が地衣体の表面近くに層を成して集合している(図2)。地衣体を構成している菌類と藻類の種類が決まっており(一対一対応)、また地衣体を形成する過程に於いて、藻類が何らかの関わりを持っていることが指摘されている。ところで地衣類は、地衣成分を二次代謝産物として作っている。地衣成分は地衣体表層や地衣菌の細胞表面に集積している。地衣成分のはたらきについては、実験室内で他の生物(藻類、菌類、植物、微生物など)の生長への影響について多く研究されてきた。特に関心を持ったのは、近接して生育する藻類、蘚苔類、高等植物などの光合成への影響である。本研究では、地衣成分の光合成電子伝達系に対する影響を調べるため、PAM 蛍光測定装置を使い、①人工的電子伝達系を用いた実験系の確立と②地衣成分の光合成電子伝達系での阻害様式のモデル化を試みた。また、③地衣成分の影響について、地衣共生藻と他の(藻類、苔類、高等植物)での違いについて比較検討を行った。

1. 地衣培養組織を用いた地衣共生藻の分離培養法の確立

本研究で使用する地衣共生藻を準備するため、*Ramalina* 属地衣について山本法(図3)により地衣組織培養を行った。この培養方法の利点は、共生藻と共生菌を同時に培養することができること、また、子器を付けない地衣についても培養することができることである。コンタミの割合も低い。培養では *Ramalina* 属の2種ともに、植え付けしたほとんどの試験管で共生藻と共生菌の増殖が見られた。培養地衣組織の断面を調べると天然地衣で見られるような組織構造をしているのではなく藻と菌が混在した状態であり、藻と菌の強い結びつきは見られなかった。地衣共生藻を分離培養する方法は、これまでマイクロピペット法、スプレー法などあるが、山本法により培養した培養地衣組織から地衣共生藻を分離する方法を新しく開発した。この方法のメリットは、山本法に従い大量に植え付けることで、地衣共生藻だけのカルスができる可能性が高いこと、大量に培養することができることなど、生理活性を調べるときに用いるのに適している(図4)。

2. 植物の光合成電子伝達系への地衣成分の影響について～PAM 蛍光測定装置を用いた測定～

太陽からの光エネルギーが植物体で光合成に使われる以外に蛍光や熱として放射される(図5)。この蛍光強度を測定することにより光合成の状態を調べることができる。Shreiber (1993) はパルス変調した光を用いた PAM 蛍光測定装置を開発し、実験室での光合成実験以外に、野外でも植物の光合成活性を簡便に測定する事ができるようになった。最も基本的な測定法は、クウェンチング分析法である。図6はクロロフィル蛍光による変動パターンを示している。図のように測定光、作用光、飽和光を照射し、光合成活性を表す量子収率($F_m' - F$)/ F_m' 、光合成活性のポテンシャルを表す最大量子収率($F_m - F_0$)/ F_m を求めることができる。図7は、チラコイド膜での人工的電子伝達系を模式的に表したものである。電子供与体として DPC や水も使い、電子受容体として SiMo や DMBQ、FeCN などを用い、人工的電子伝達系を作製し、PAM 蛍光測定装置を用い光合成阻害実験を行い、電子伝達系での影響を調べた。Barbatic acid については、10 μ M の低濃度で、光照射下で

定常状態の蛍光レベル F が増加し、光照射下の量子収率 $(F_m' - F)/F_m'$ が低下した。また、暗所適応後の F_m と最大量子収率 $(F_m - F_o)/F_m$ が劇的に減少した。このタイプの変化は、P680 の酸化側が阻害されたときにしばしば観察される (図 8)。次に低濃度の *barbatic acid* の影響が PSII 複合体の中にあるかどうか調べるために、電子受容体 DMBQ を用いて調べると 10 μM の *barbatic acid* の添加により、クロロフィル蛍光の急速な増加が観測された (図 9)。これは、阻害部位が PSII 複合体の中にあることを示す。還元側の阻害が、 Q_A の上流か下流か調べるため、 Q_A からのみ電子を受け取る SiMo を用い、酸素発生の測定を行った。表 1 に示すように *barbatic acid* と Q_B の典型的な阻害である DCMU の影響の比較から、*barbatic acid* の主な阻害は Q_A の下流であること、 Q_A やその上流でも少し阻害があることを初めて明らかにした。暗所適応後の F_v/F_m に影響する阻害部位が、酸素発生複合体または D1 タンパク質の中にあるかどうか調べるため、トリス処理により酸素発生複合体を外し、DPC を用いて、*barbatic acid* の阻害の影響を調べた (図 10)。実験より *barbatic acid* の阻害が、 Y_z か Y_z の下流であることを明らかにした。

3. Atrazine 耐性タバコ細胞 PSII 膜での地衣成分 (*barbatic acid*) による阻害～光合成電子伝達系での地衣成分による阻害部位・阻害様式の検討～

Atrazine 耐性タバコ細胞を用い、地衣成分のチラコイド電子伝達系での阻害部位・阻害様式について検討を行った。除草剤の atrazine に耐性を持つタバコ培養細胞は、D1 タンパク質の *psbA* 遺伝子の 264 番目がセリン (AGT) からスレオニン (ACT) 変異している。atrazine 耐性株 (B,D) は野生株 (WT) に比べて *barbatic acid* に対して P680 の還元側により高い感受性を示した (図 11)。フェノールタイプの除草剤である Dinoseb についても、atrazine 耐性株では P680 の還元側が高い感受性を示した (図 12)。このことから *barbatic acid* は除草剤の Dinoseb と同じタイプの阻害を示すことが考えられる。これまでフェノールタイプの除草剤の正確な結合様式は明らかにされていない。Shigematsu *et al.* (1989) が明らかにした atrazine 耐性タバコ培養細胞でのフェニール尿素に関するこれまでのモデルは、フェノールタイプの除草剤の結合モデルを考える上で基礎となる。このモデルを参考にすると、地衣成分と電子伝達系 Q_B 部位との結合は、強い疎水性の相互作用による結合を考慮することができる。

4. 地衣成分による阻害の影響 植物種による違い

地衣成分の光合成電子伝達系での影響について、地衣成分 5 種 (*barbatic acid*, *diffRACTAIC acid*, *evernic acid*, *salazinic acid*, *usnic acid*) を用い、地衣共生藻 3 種 (*Trebouxia impressa*, *Trebouxia.sp.*, *T. excentrica*)、*Chlamydomonas reinhardtii*、苔類培養細胞 (*Marchantia paleacea*)、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum*) について、P680 の酸化側・還元側での阻害をチラコイドレベル、細胞レベルで調べた (表 2, 3)。チラコイドレベルでは地衣成分による阻害は P680 の還元側と酸化側のいずれでも、地衣共生藻と他の植物種との間ではっきりとした違いは見られなかった。それに対して細胞レベルでは、地衣共生藻では、反応緩衝液で溶かすことのできる最も高い濃度でも阻害効果を示さなかったのに対して、他の植物種では相当レベルの阻害を示した。

ホウレンソウを用いた実験より PSII の Q_B 部位が *barbatic acid* による最初のターゲットであること、クロロフィル蛍光のパラメーターである $(F_m' - F)/F_m'$ と $(F_m - F_o)/F_m$ が、それぞれ P680 の還元側と酸化側の PSII 阻害の指標として使うことができることを明らかにした。また、atrazine 耐性タバコ細胞の実験より *barbatic acid* による阻害様式はフェノール系の除草剤と同じである可能性を初めて示した。さらに、地衣共生藻と他の植物種の間での地衣成分による阻害について、チラコイドレベルでは、はっきりした違いは顕れなかった。それに対して、細胞レベルでは、他の植物種では相当レベルの阻害が見られたが、地衣共生藻では、ほとんど阻害を示さなかった。ところで近年植物の二次代謝産物について、動くことのできない宿命をもつ植物が自らの身を守るために、進化の途上で身につけた防御物質であるとする「アレロパシー仮説」が提唱されている (藤井 2000)。本研究では、実験室での実験で地衣成分が他の植物種の光合成を阻害することによりアレロパシーの可能性があることは示された。しかし、地衣成分の疎水性な性質から地衣体から放出され、土壌に高い濃度で集積すると考えるより、地衣体の表面や岩屑などに集積し、地衣体の上で発芽したり地衣体の近くで生育する藻類や苔類などの光合成生物の生育を阻害するとする方が妥当性が高い。この「微小地域でのアレロパシー」について検証するには、さらに野外での調査・研究が必要である。



図 1 *Ramalina siliquosa*

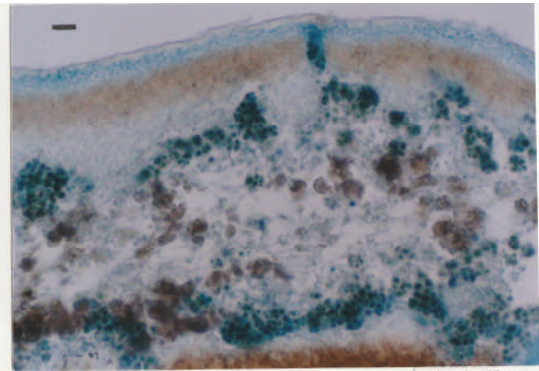


図 2 *R. siliquosa* の組織断面

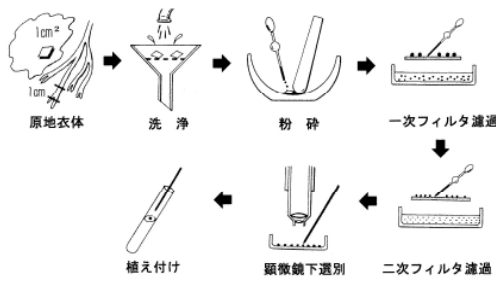


図 3 地衣組織培養法

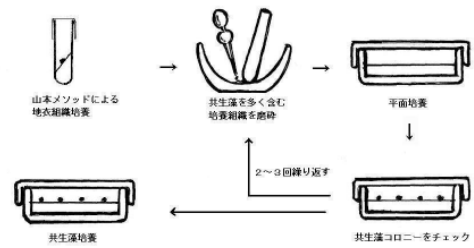


図 4 共生藻分離・培養法

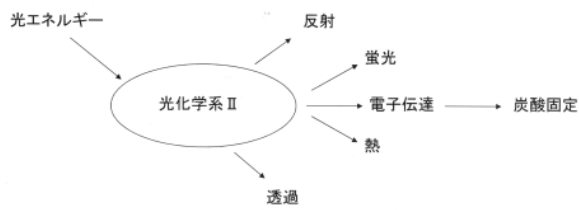


図 5 光エネルギーの行方 (遠藤 2002)

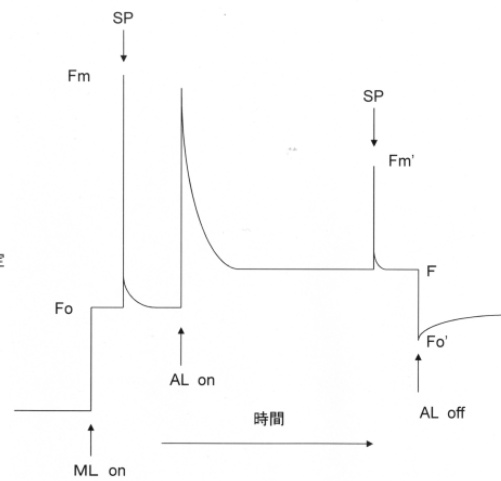


図 6 蛍光の変動パターン (遠藤 2002)

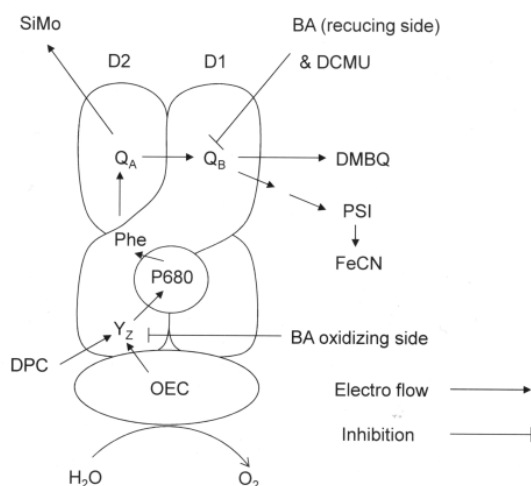


図7 人工電子伝達系 電子の流れと阻害部位

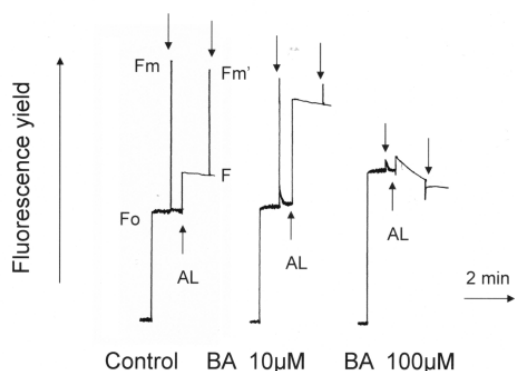


図8 蛍光誘導での barbatic acid (BA)の影響

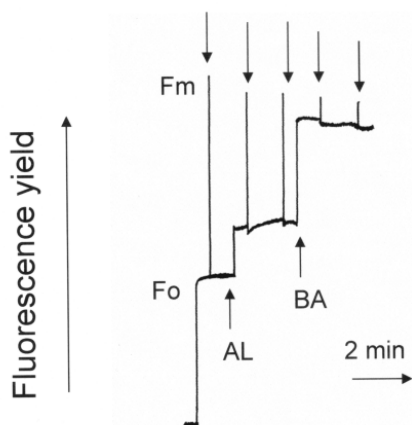


図9 PSII膜での蛍光誘導でのBAの影響

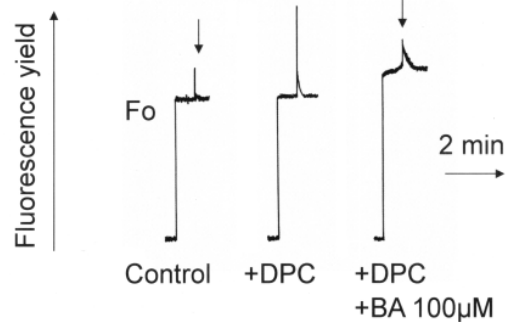


図10 トリス処理したPSII膜での蛍光誘導 (DPCとBAの影響)

表1 SiMoを用いた人工電子伝達系における barbatic acidとDCMUの酸素発生活性に対する影響

	-SiMo (A)		+SiMo (B)		(B)-(A)
Control	100	±10.5	n.d.		
BA	7.7	±2.19	33	±3.8	25
DCMU	5.1	±1.68	43	±2.3	38

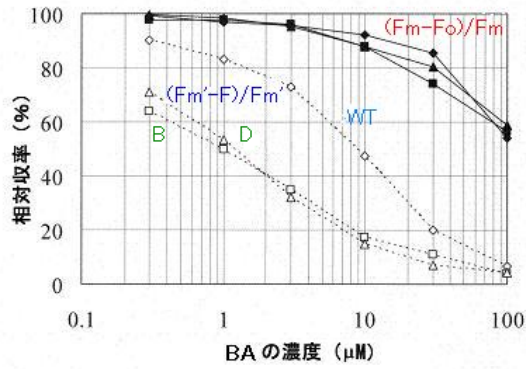


図 11 BA の濃度と量子収率の変化

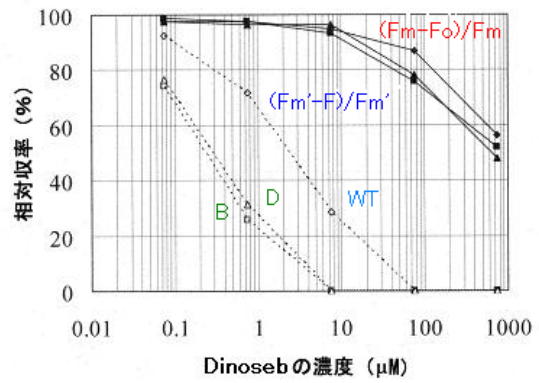


図 12 Dinoseb の濃度と量子収率の変化

表 2 光合成生物（植物種）の P680 還元側における地衣成分による半阻害濃度（μM）

		Barbatic acid	Diffraitaic acid	Evernic acid	Salazinic acid	Usnic acid
<i>Nicotiana tabacum</i>	Thylakoid	8.9	100	17	>1000	170
	Cell	47	180	120	>1000	120
<i>Marchantia paleacea</i>	Thylakoid	14.0	97	45	>1000	330
	Cell	33	100	53	>1000	93
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Thylakoid	15.0	90	23	>1000	310
	Cell	>100	130	250	>1000	140
<i>Trebouxia impressa</i>	Thylakoid	7.1	94	35	>1000	200
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>Trebouxia sp.</i>	Thylakoid	4.5	80	25	>1000	160
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>T. excentrica</i>	Thylakoid	7.5	120	30	>1000	20
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600

表 3 光合成生物（植物種）の P680 酸化側における地衣成分による半阻害濃度（μM）

		Barbatic acid	Diffraitaic acid	Evernic acid	Salazinic acid	Usnic acid
<i>Nicotiana tabacum</i>	Thylakoid	>100	430	400	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	430
<i>Marchantia paleacea</i>	Thylakoid	54	180	400	>1000	>600
	Cell	97	220	420	>1000	>600
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Thylakoid	>100	160	300	>1000	560
	Cell	>100	160	350	>1000	140
<i>Trebouxia impressa</i>	Thylakoid	25	260	220	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>Trebouxia sp.</i>	Thylakoid	25	250	130	>1000	290
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600
<i>T. excentrica</i>	Thylakoid	56	330	300	>1000	>600
	Cell	>100	>1000	>1000	>1000	>600

論文審査結果要旨

※単独ページとする。

地衣類が産生する地衣類特有の二次代謝産物、いわゆる地衣成分は、①抗酸化作用や紫外線吸収作用を示すことで共生藻を防御する。②重金属陽イオンと錯体を形成することにより重金属への耐性を高める。③微生物の増殖を阻害し、草食動物や昆虫の食害を防ぎ、植物の発芽や生長を抑制することにより、他生物との競合に勝利する。などの働きが確認されている。この中で植物の生長を抑制する機構、特に植物の光合成阻害機構については十分に明らかにされていない。

本研究は地衣成分の植物細胞や地衣共生藻の光合成電子伝達系に対する影響を調べるため、①地衣培養組織を用いた地衣共生藻の分離培養法の確立、②PAM 蛍光測定装置を使用し、人工的電子伝達系を用いた実験系の確立、③地衣成分の光合成電子伝達系での阻害様式のモデル化、④地衣成分の影響について、地衣共生藻と他の植物細胞（藻類、苔類、高等植物）での差異を比較検討したものである。

①*Ramalina siliquosa* および *R. litoralis* の組織培養に初めて成功し、それらの培養物を得た。得られた培養組織から共生藻を分離した。その際、富栄養培地では地衣培養組織では共生藻と共生菌との結びつきは弱く、共生藻または共生菌を容易に分離することができることを明らかにし、培養地衣組織から標準的な共生藻分離培養法を確立した。

②Barbatic acid は 10 μM で P680 の還元側(Q_B)、100 μM で酸化側(Y_Z)を阻害したこと、8種類の地衣成分を比較し、電子伝達の酸化側、還元側とも Barbatic acid が最も強く阻害すること、地衣成分の種類により酸化側と還元側の阻害部位での阻害様式が異なっていること、デプシドの左の環の水酸基のメチル化は還元側、右の環の長鎖化は酸化側の阻害に影響することを初めて明らかにした。

③Barbatic acid は Atrazine タイプの除草剤、尿素タイプの除草剤と同じ P680 の還元側の阻害を示し、その部位も同じ Q_B であること、耐性株は、Barbatic acid に対して、還元側で野生株より強い感受性を示すこと、Barbatic acid は、Atrazine タイプの除草剤や尿素タイプの除草剤とは異なった阻害様式をもち、フェノールタイプの除草剤 Dinoseb とは還元側で類似した阻害様式をもつことを初めて明らかにした。

④地衣成分が地衣共生藻においても、チラコイド膜レベルでは光合成電子伝達系を阻害すること、地衣共生藻の地衣成分に対する耐性機構は、細胞レベルで付与されていることを初めて明らかにした。その結果、光化学系 II は、他の植物の生長を抑制する地衣成分の重要な標的であることを明らかにした。

地衣類、特に地衣共生藻の生理学的な解明はほとんど進んでいない。また、地衣成分の地衣共生藻を含め、植物細胞に対する光合成阻害についても、そのメカニズムや構造相関を調べた研究報告はほとんどない。本研究は、地衣成分の光合成阻害の先駆けとなる研究であり、地衣共生藻と地衣成分の関係を初めて解明にした価値ある研究である。地衣学全体にとっても重要な研究成果である。2014年8月27日に開催された公開審査会ならびにその後行われた非公開審査会において、発表内容とともに発表能力や質疑応答能力についても検証を加え、十分な発表内容と能力を有していると確認できた。以上の審査結果から審査委員一同は博士の学位を授与するに値すると判断した。